

FR 98/02819



REC'D 25 JAN 1999

WIPO

PCT

5

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

09/582482

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 DEC. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (CONT)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 24 DEC. 1997 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT L7 97 16727 DATE DE DÉPÔT 24 DEC. 1997	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE RHONE-POULENC AGROCHIMIE DPI Franck TETAZ 14/20 Rue Pierre Baizet 69009 LYON France
---	--

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	n° du pouvoir permanent 06229 références du correspondant PH 97089 téléphone 04.72.85.25.92 date
---	---

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

procédé de préparation enzymatique d'homogénéisate

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination RHONE-POULENC AGROCHIMIE Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 14/20 Rue Pierre Baizet LYON 9° Pays FRANCE	Forme juridique
--	-----------------

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée	En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission	

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE			
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date	8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire, n° d'inscription) Le Responsable Franck TETAZ	SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION A. CHAPELAIN	SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI
---	---	--	---

La loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0 9716727

PH 97089

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé de préparation enzymatique d'homogénéisate

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHONE-POULENC AGROCHIMIE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

SAILLAND Alain
38 Rue Albert Chalinel
69009 LYON FRANCE

DEROSE Richard
216 Rue de St Cyr
69009 LYON FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 23 Décembre 1997

Franck TETAZ

Procédé de Préparation enzymatique d'homogentisate

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation enzymatique d'homogentisate, composé essentiel à la vie des plantes. L'homogentisate (ci-après HMO), ou acide 2,5-dihydroxy-phényl acétique est le produit de transformation enzymatique du 4-hydroxyphénylpyruvate (ci-après HPP) par la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (ci-après HPPD). Les inhibiteurs de cette enzyme sont des composés herbicides qui bloquent la production d'HMO dans la cellule végétale (Pallett K. E. et *al.* 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). Lorsque l'on fait germer des plantes, d'*Arabidopsis thaliana* par exemple, sur milieu synthétique en présence d'un inhibiteur de l'HPPD, les plantes vont germer, rester blanches puis mourir très rapidement. Or, si dans le milieu synthétique additionné d'un inhibiteur de l'HPPD, on ajoute de l'HMO les plantes vont germer normalement et rester vertes tant que le milieu contiendra de l'HMO.

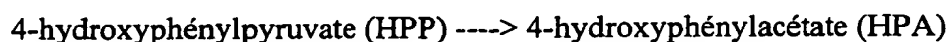
Il est donc important de pouvoir disposer d'HMO pour prévenir les carences des plantes liées à un dysfonctionnement métabolique de la biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP, et plus particulièrement un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP insensible aux inhibiteurs de l'HPPD.

Le procédé selon l'invention consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes:

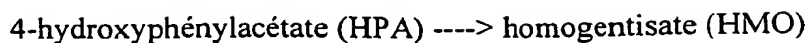
- conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (ci-après HPA) par une première enzyme appropriée, puis
- conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.

La première réaction enzymatique suivante



est catalysée par une HPP-oxydase appropriée. De telles oxydases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone, le transformant en HPA, plus particulièrement chez un *Arthrobacter* où une telle oxydase responsable d'une étape du catabolisme de la tyrosine (Blakley, E.R. 1977 Canadian Journal of Microbiology 23 1128-1139).

La deuxième réaction enzymatique suivante :



est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée. De telles hydroxylases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone, le transformant en HMO, plus particulièrement chez *Pseudomonas acidovorans*, souvent appelée *Comamonas acidovorans*. (Hareland, W.A. et al 1975 Journal of Bacteriology 121 272-285) chez certaines *Xanthobacter* (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1986 Antonie van Leeuwenhoek 52 309-318), chez *Pseudomonas alcaligenes* (Karigar C. S. et Pujar B. G. 1993 FEMS Microbiology Letters 110 59-64), chez *Flavobacterium sp* (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1988 Arch Microbiol. 149 207-213), chez *Bacillus subtilis* (Crawford R. L. 1978 FEMS Microbiology Letters 4 233-234), chez *Nocardia sp* DM1 (Raju S. G. et Vaidyanathan C. S. 1986 J.Indian Inst. Sci. 66 511-520) et chez *Rhodococcus erythropolis* (Suemori A. et al. 1996 Journal of Fermentation And Bioengineering Vol 81, N°2 133-137).

De manière avantageuse, l'HPA-hydroxylase employée dans le procédé selon l'invention est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les deux réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.

Les deux enzymes appropriées peuvent être introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme d'extrait protéique, ledit extrait protéique pouvant être brut ou purifié totalement ou en partie, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés. Elles peuvent être ainsi produites in situ par chaque organisme biologique produisant naturellement les deux enzymes, ou encore par un seul organisme biologique modifié de manière qu'il produise les deux enzymes. Cet organisme biologique peut être une bactérie, une levure ou encore une cellule végétale.

Les deux enzymes étant insensibles aux inhibiteurs de l'HPPD, le procédé selon l'invention peut être conduit en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.

Le milieu réactionnel approprié est constitué par tout milieu aqueux dont les conditions de température, de pH et de force ionique sont appropriés pour les réactions enzymatiques. Lorsque les enzymes sont produites in situ par un ou plusieurs organismes biologiques, le

milieu réactionnel est approprié pour la croissance desdits organismes.

En fin de réaction, l'HMO peut être isolé du milieu réactionnel et purifié, ou bien laissé dans le milieu réactionnel. Dans ce deuxième cas, le milieu réactionnel contenant l'HMO peut être employé comme milieu nutritif pour la culture de plantes, plus particulièrement pour la culture de plantes présentant un dysfonctionnement métabolique de la biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

10 Exemple 1: Production d'HPA à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter*

Culture d'*Arthrobacter* :

Arthrobacter globiformis est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu A supplémenté avec 0,1% L-tyrosine et 0,01 % d'extrait de levure [milieu A composé en gramme par litre de KH_2PO_4 (1,5) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (3,5) NH_4NO_3 (1) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01) $\text{NaMoO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05)]..

Extraction et dosage de l'activité HPP-oxidase.

A partir de 2,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 3000 xg pendant 15 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé. Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

Le culot de cellules, environ 3,4g est resuspendu dans 7 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0,05M pH7,5, TPP 0,1mM, MgCl_2 0,1mM et mercaptoethanol 5mM) et soniqué à 23kHz pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à 44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant faisant 7 ml est additionné de 0,7 ml de protamine sulfate 2% dans le tampon d'extraction suivi d'une agitation douce. Le précipité qui se forme est éliminé par une centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le surnageant ainsi obtenu est additionné graduellement de sulfate d'ammonium pour arriver à 60% de la saturation. Cette nouvelle préparation est agitée 30 min. et le précipité formé récolté par centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le culot est resolubilisé dans 0,5 ml de tampon d'extraction et aliquoté en fractions de 0,1ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

L'activité HPP-oxidase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200 µl de

réaction par puits consistant en 149,8 µl de sodium phosphate 67 mM pH7,4, 10µl de glutathion 13,4mM, 10µl de MgCl₂ 67 mM, 10µl de TPP 26,7mM, 10µl de FAD 67µM, 0,2µl de protéine (soit environ 6µg) et 10 µl d'HPP 2,5mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2µl de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10mM dans un tampon phosphate contenant 20% DMSO.

La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 50 µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

6 min.: 15% de tampon B

15 6,5 min.: 15% de tampon B

7 min.: 60 % de tampon B

8 min.: 60 % de tampon B

8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm.

20 Le HPA produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPP est comparé à une référence constituée d'HPA commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

Résultats.

L'analyse HPLC montre que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis* cultivée sur tyrosine comme source majeure de carbone, est capable de transformer l'HPP en HPA (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HPA commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée par 100 µM d'inhibiteur de l'HPPD.

Exemple 2: Production d'HMO à partir d'HPA avec un extrait protéique de
30 ***Pseudomonas***

Culture de l'organisme.

Pseudomonas acidovorans est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures

en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu B supplémenté avec 0,15% HPA et 0,01 % d'acide nitrilotriacétique. [milieu B composé en gramme par litre de NaH_2PO_4 (1) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4,25) NH_4Cl (2) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,012) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,003) $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,003) $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2).]

5 Extraction et dosage de l'activité HPA-hydroxylase.

A partir de 0,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 7500 xg pendant 10 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé.

Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

Le culot de cellules, environ 0,5 g est resuspendu dans 1,5 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0,1 M pH7,2, DTE 1 mM, MgMgSO_4 5mM) et soniqué à 23 kHz pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à 44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant est aliquoté en fractions de 0,1ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

L'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200µl de réaction par puits consistant en 150 µl de sodium phosphate 0,1M pH7,2, 10µl de DTE 20 mM, 10µl de NADH 3 mM, 15µl de FAD 67µM, 10µl de protéine (soit environ 7µg) et 5 µl d'HPA 10 mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2µl de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10 mM dans un tampon phosphate contenant 20% DMSO.

La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPA, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 10µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

0,8 min.: 0% de tampon B

1 min.: 60% de tampon B

1,7 min.: 60 % de tampon B

1,9 min.: 0 % de tampon B

5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 292 nm.

Le HMO produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPA est comparé à une référence constituée d'HMO commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

Résultats.

5 L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait de *Pseudomonas acidovorans* est capable de transformer l'HPA en HMO (la molécule produite co-migre parfaitement avec l'HMO commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée dans nos conditions de test par 100µM d'inhibiteur d'HPPD.

10

Exemple 3: Production d'HMO à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter* et de *Pseudomonas*

L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase

15 L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200µl de réaction par puits consistant en 100 µl de sodium phosphate 100 mM pH7,2, 10µl de DTE 20 mM, 10µl de NADH 3 mM, 15µl de FAD 67 µM, 10µl de glutathion 13,4 mM, 10µl de MgCl₂ 67 mM, 10µl de TPP 26,7 mM, 2µl d'extrait HPP-oxidase (soit environ 60 µg), 25µl d'extrait d'HPA-hydroxylase (soit environ 18 µg) et 10 µl d'HPP 10 mM.

20 La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant 30 min sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 25µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

25 Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

6 min.: 15% de tampon B

6,5 min.: 15% de tampon B

7 min.: 60 % de tampon B

30 8 min.: 60 % de tampon B

8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm et 292 nm simultanément

Résultats.

L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis* associé à celui de *Pseudomonas acidovorans* est capable de transformer simultanément l'HPP en HMO (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HMO commercial de référence).

5

Revendications

1. Procédé de préparation enzymatique d'homogénisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes:

- conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis
- conversion enzymatique de HPA en HMO par une enzyme deuxième appropriée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première conversion enzymatique est catalysée par une HPP-oxydase appropriée.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient d'*Arthrobacter*.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la deuxième conversion enzymatique est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les bactéries sont choisies parmi *Pseudomonas acidovorans*, *Xanthobacter*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Flavobacterium* sp, *Bacillus subtilis*, *Nocardia* sp DM1 et *Rhodococcus erythropolis*.

8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les deux réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les deux enzymes appropriées sont introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme d'extraits protéiques, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est réalisé en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.